
Macrophage 분화에 미치는 Glycated-LDL 및 몇 가지 Effector의 영향

조현미 · 유승재 · 정희경 · 오수영 · 황기철¹ · 장양수¹ · 신승언² · 김태웅

강원대학교 생화학과, 연세대학교 심혈관연구소¹, 한림대학교 환경생명과학연구소²

Cell Differentiation of Macrophage with Glycated-LDL in the Presence of Effectors

Hyun-Mi Cho, Seung-Jae You, Hee-Kyung Jeung, Sue-Young Oh, Ki-Chul Hwang¹,
Yang-Su Jang¹, Seung-Uon Shin² and Tae-Woong Kim

Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
Yonsei Cardiovascular Research Center, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea¹
Institute of Environment & Life Sciences, Hallym University, Chuncheon, Korea²

Abstract

Objective: Glycation of LDL is significantly increased in diabetic patients. There is accumulating evidence that glycation of circulating lipoproteins, is implicated in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis. Glycation, the nonenzymatic binding of glucose to protein molecules, can increase the atherogenic potential of certain plasma constituents, including low-density lipoprotein (LDL). In the present experiment, we investigated the proliferation of macrophage with glycated-LDL in the presence of several effectors such as M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), PMA (Phorbol-12 Myristate 13-Acetate), LPS (Lipopolysaccharide) and dexamethasone.

Methods: Fresh LDL was glycated for 0, 10, 30, 60 and 180 days and differentiation of human monocyte derived macrophage(HMDM) was tested. Also, glycated-LDL (50 μ g/mL) with effectors such as M-CSF(15 ng/mL), PMA(120 ng/mL), LPS(10ng/ml) and dexamethason(1 μ g/ml) were incubated on HMDM and compared differentiation with MTT assay.

Results: From the results, glycation of LDL increased differentiation of macrophage. And, M-CSF and PMA increased the differentiation of macrophage whereas LPS and dexamethason decreased.

Conclusion: It is thought that several effectors are involved in development of atherosclerosis, and we obtained the following conclusion that M-CSF and PMA might influence the development of atherosclerosis because they increased the viability of macrophage.

Key Words: Glycated-LDL (gly-LDL), Atherosclerosis, macrophage, M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), PMA (Phorbol-12 Myristate 13-Acetate), LPS (Lipopolysaccharide), Dexamethason

책임저자 : 김태웅

강원도 춘천시 효자동 강원대학교 생명과학부 생화학전공, Tel: 033)250-8515, Fax: 033)242-0459

E-mail : tawkim@kangwon.ac.kr

서론

동맥경화는 오랜 기간에 걸쳐 발병하는 질병으로 혈관벽에 지질성분이 축적되어 쌓이는 것을 특징으로 들 수 있으며 현재까지도 높은 사망 원인이 되는 질병으로 분류되고 있다¹. 동맥경화와 관련된 많은 위험 인자들이 알려져 왔는데, 대표적으로 높은 혈청 콜레스테롤 농도, 흡연, 비만, 고혈압 등을 들 수 있으며, 이러한 인자들은 관상동맥질환에 영향을 주게 된다². 혈청 콜레스테롤은 대부분이 LDL이 운반하기 때문에 동맥경화의 병변에는 cholesterol ester가 많은 양 발견되고 있다. 최근, 동맥경화와 관련된 당뇨병(Diabetes)의 합병증세는 주요 연구대상이 되고 있다. 당뇨병 환자인 경우 사망원인의 2/3 이상이 Coronary Heart Disease (CHD)에 의한 것으로 알려지고 있으며, 최근의 Joslin Clinic의 보고에 의하면, insulin-dependent-diabetes mellitus (IDDM) 환자의 1/3이 CHD증세를 가지고 있다. Diabetes에서 다량 존재하는 glucose는, 환원당과 환원대사물질에 의한 생체단백질의 Glycosylation은 노화현상의 주요현상의 하나가 된다.

동맥경화의 발병기작을 살펴보면 혈중에 있는 lipoprotein의 농도가 높아지거나 혹은 여러 요인에 의해 lipoprotein에 변화가 일어나게 되면 endothelial cell에 손상을 주게 된다. endothelium은 lipoprotein의 운반을 조절하는 carrier의 역할 이외에 LPL (lipoprotein lipase)이 분포되어 있어 TG (triacylglycerol)를 distribution하는데 중요한 역할을 한다^{1,3,14}. TG-rich lipoprotein, chylomicron, hepatic VLDL, LDL 등의 과도한 혈중내 농도는 endothelial cell에 직·간접적으로 손상을 일으키게 된다⁴. endothelium이 손상을 입게되면 LDL이 endothelial cell을 통과하여 subintimal space에 축적되며 circulating monocyte가 endothelial cell에 달라붙게 되고 subintimal space에 자리잡게 되어 macrophage로 분화하게 되고 cholesterol-rich LDL

을 uptake하게 되는데 여기에는 scavenger receptor가 관여한다⁵. macrophage에 의해 생성, 분비되는 cytokine으로는 TNF, IL-6, M-CSF, IL-1 β 등이 있는데 특히 IL-1 β 의 경우 양의 적고 많음에 따라 동맥경화의 진행상황을 측정하는 지표로 쓰이기도 한다^{6,7,8}.

본 연구에서는 modified LDL의 일종인 glycated-LDL에 몇 가지의 effector들을 첨가하여 macrophage의 differentiation을 비교하여 보았다. 사용한 effector로는 M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), LPS (Lipopolysaccharide), PMA (Phorbol-12 Myristate 13-Acetate), dexamethasone 등이며, 이들은 cell의 분화에 촉진 혹은 억제하는지 알아보았다. 시간별로 incubation된 glycated-LDL을 사용하여 최적의 effector 농도를 알아본 실험도 병행하였다. macrophage의 증가는 직접적으로 동맥경화 또는 당뇨에 의한 동맥경화의 발병 원인으로 볼 수 있으므로, 본 실험에서는 glycated-LDL (gly-LDL)과 effector들을 이용하여 이들이 macrophage에 미치는 영향을 *in vitro*에서 비교하였다.

재료 및 방법

1. 시약

M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), PMA(Phorbol-12 Myristate 13-Acetate), LPS (Lipopolysaccharide), Dexamethasone, RPMI 1640, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), RBC lysis buffer, Penicillin, Ficoll/Hypaque, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 등은 Sigma Chemical Company (St, Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였고, 15, 50 mL tube와 12 well plate는 Corning (U.S.A)에서 구입하였다. FBS (Fetal Bovine Serum)는 Cal Biochem (La, Jolla, CA)에서 구입하여 사용하였으며 Whole blood와 plasma는 대한적십자사 혈액원에서 구입하여 본 실험에

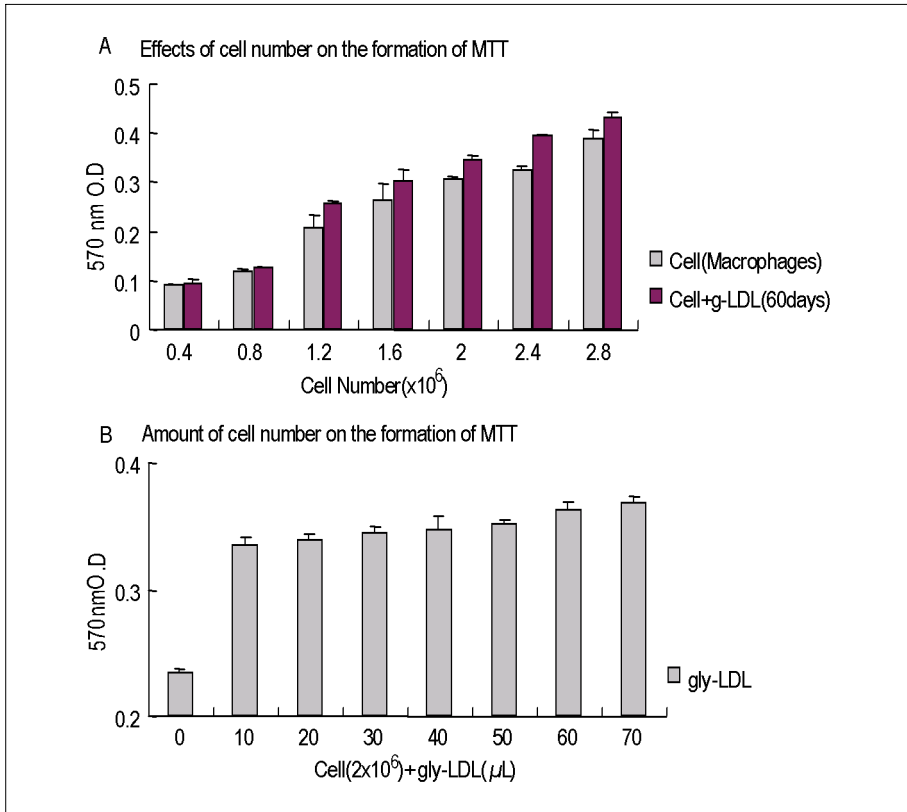


Fig. 1. Effects of A) cell numbers, and B) amount of glycosylated-LDL

A. Indicated cell numbers were incubated with 50 μ g/mL of glycosylated-LDL for 30hours and tested after that time

B. Macrophage cells were incubated with indicated amount of glycosylated-LDL. After 30hours of incubation, macrophage cells were tested as MTT method

사용하였다.

2. LDL의 분리와 Glycation.

혈액원으로부터 구입한 정상인의 혈장을 재료로 하여 KBr로 density (1.019~1.063 g/mL)를 맞춘 후 초원심분리기를 이용하여 분리하였다. 원심분리 과정에는 0.05% EDTA, 0.05% NaN_3 그리고 aprotinin을 첨가하였다. 위의 과정을 통해 분리된 LDL을 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 24시간 동안 4℃에서 투석한 뒤 농도는 Lowry method를 통해 결정하였다¹⁷. LDL glycation²²은 먼저 LDL (4 mg/mL)에 100 mM의 glucose

와 pH 7.4의 PBS를 넣어준 후 배양기의 온도를 37℃로 고정시켜서 실험에 필요로 되는 시간만큼 배양하였다. 단백질과 반응하지 않은 glucose를 제거하기 위해 pH 7.4의 PBS를 이용하여 투석 한후에 본 실험에 사용하였으며 glycation은 Seishi의 방법¹⁸과 agarose gel electrophoresis로 확인하였다.

3. Whole blood로 부터의 HMDM(human monocyte derived macrophage)의 분리

채혈한지 24시간 이내의 혈액을 구입하여 Fogelman²⁰의 방법에 따라 Ficoll/Hypaque gradient

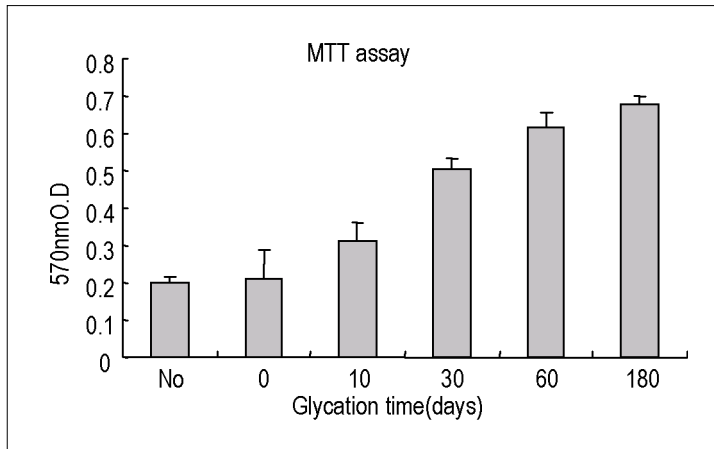


Fig. 2. Effects of degree of glycation on macrophage differentiation
Macrophage cells were incubated with 50 μ g/mL of each glycated-LDL. Differentiation and viability of macrophages were determined as described in the method sections.

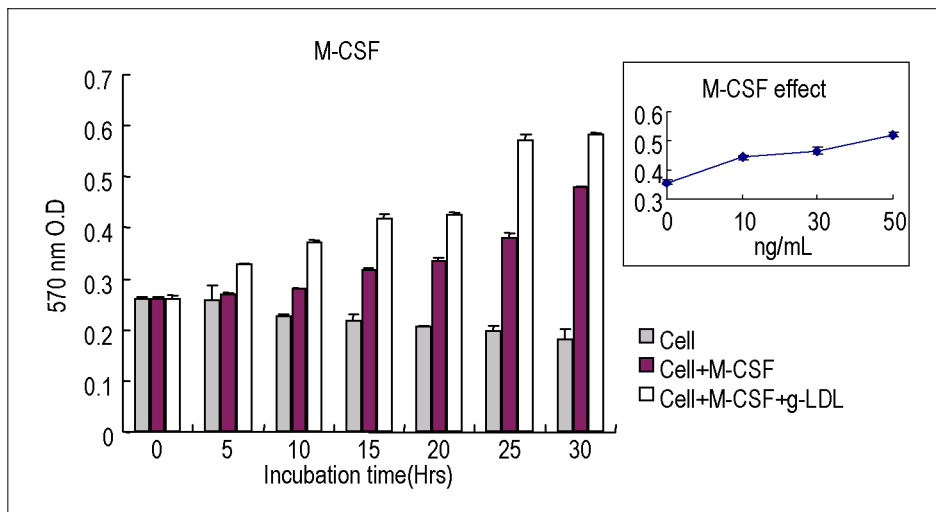


Fig. 3. Effects of M-CSF and gly-LDL on macrophage differentiation

M-CSF (15 ng/mL) and gly-LDL were added after 4 hour preincubation Cells were washed three times with 100 μ L of RPMI 1640 (10% FBS), and then MITT added for assay.

centrifugation을 이용하여 분리하였다. 동량의 혈액을 Ficoll/Hypaque 위에 pasteur pipet으로 섞이지 않게 조심스럽게 올려놓고 2,500 RPM에서 20분간 원심분리한다. 이렇게 하면 네 개의 층으로 분리되는데 mononuclear cell을 얻은 후, HBSS로

씻어준 후 다시 순차적으로 2,100, 1,800, 1,500, 1,100 RPM에서 10분간 원심분리한다. 이것을 다시 적정량의 HBSS로 희석한 후 소량을 취해 trypan blue로 염색하여 hemacytometer로 cell수를 결정한 후 plating한다. 본 실험에 사용된 cell의

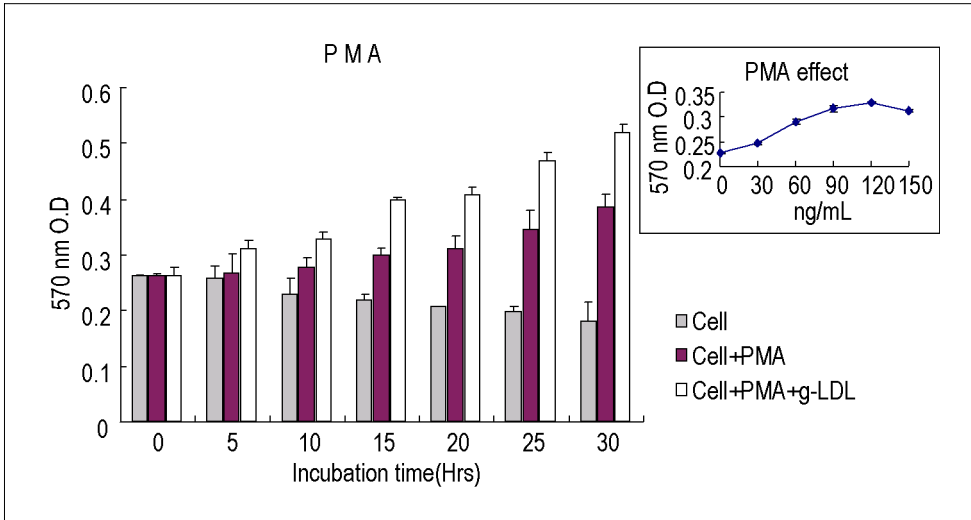


Fig. 4. Effects of PMA and gly-LDL on macrophage differentiation

PMA (120 ng/mL) and g-LDL were added after 4 hours preincubation. Cells were washed three times with 100 μ L of RPMI 1640 (10% FBS), and then MTT added for assay.

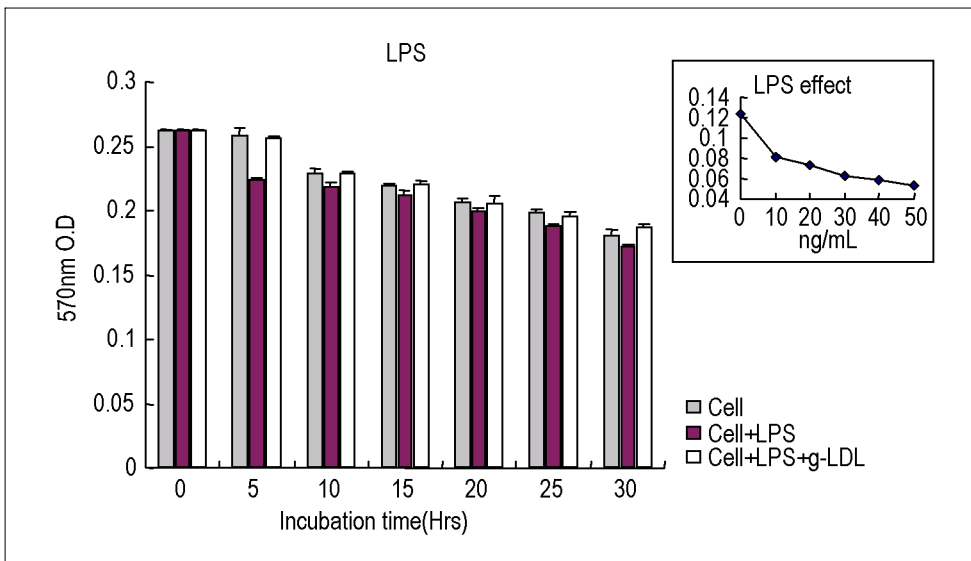


Fig. 5. Effects of LPS and gly-LDL on macrophage differentiation

LPS (10 ng/mL) and gly-LDL were added after 4 hours preincubation. Cells were washed three times by 100 μ L of RPMI 1640 (10% FBS), and then MTT added for assay.

수는 2×10^6 /well이다.

2×10^6 /well의 세포를 plating한 후 약 3시간 가량 serum이 없는 RPMI 1640을 이용하여 prein-

cubation한 후에 상층액을 제거하고 10% FBS를 포함한 RPMI 1640 100 μ L로 세 번 washing한 후, 5% CO₂ gas를 포함하고 있는 배양기에서 2일 배

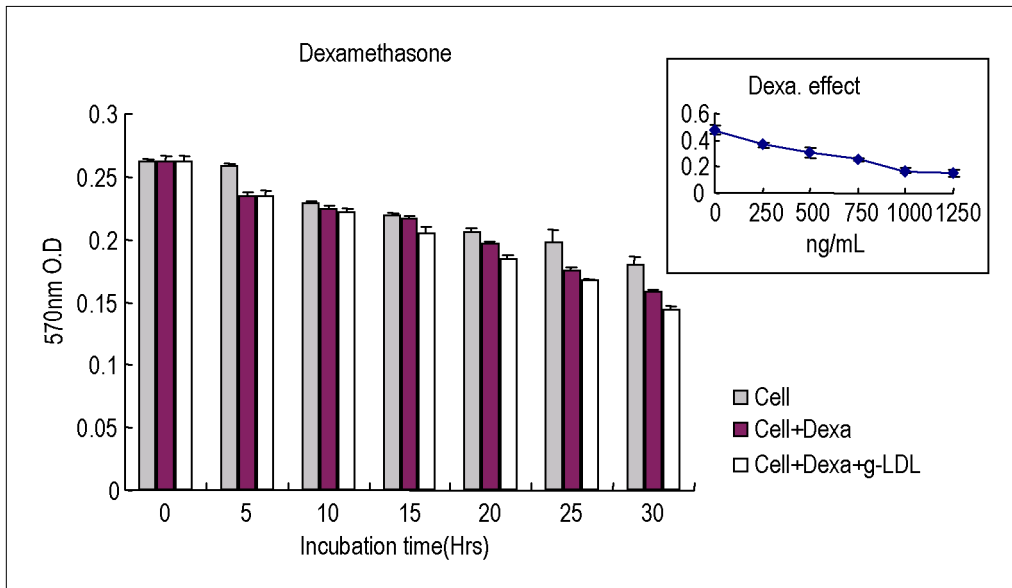


Fig. 6. Effects of dexamethasone and gly-LDL on macrophage differentiation

Dexamethason ($1 \mu\text{g/mL}$) and gly-LDL were added after 4 hours preincubation. Cells were washed three times by $100 \mu\text{L}$ of RPMI 1640 (10% FBS medium), and then MTT added for assay.

양하여 macrophage로 전환시킨 후 각각의 실험을 하였다.

4. MIT assay

macrophage의 분화를 측정한 방법으로, 30시간 배양한 macrophage에 MTT시약을 넣고 다시 4시간 배양한 후 여기서 생긴 blue formazan을 dissolve하기 위해 0.01N HCl 에 희석된 10% SDS로 반응을 중지 시켰다. 다시 16시간 배양후 spectrophotometer를 이용하여 570 nm 에서 흡광을 측정하였다²².

결 과

1. Glycated LDL이 macrophage의 분화와 생존력에 미치는 영향

본 실험에서는 glucose 100 mM 과 LDL을 incuba-

tion한 후, PBS buffer로 dialysis시켜 glycated LDL을 만들었으며, incubation 시간을 조절하여 몇 종류의 glycated-LDL ($10, 30, 60$ 및 180 일)을 *in vitro*에서 제조하여 사용하였다. 먼저 최적의 cell수와 glycated-LDL의 양을 알아보기 위한 실험의 결과는 Fig. 1과 같았다. Fig. 1-A는 macrophage수의 증가에 따른 cell의 분화와 여기에 60 일된 glycated-LDL의 첨가에 따른 cell의 분화 변화를 나타낸 것으로, cell의 수가 증가할 때 및 macrophage에 glycated-LDL을 첨가하였을 때 모두, cell이 증가하는 결과를 나타내고 있다. Fig. 1-B는 일정수 (2×10^6)의 macrophage와 glycated-LDL의 양을 변화시킴으로써 glycated-LDL이 macrophage의 분화에 나타내는 영향을 알아 본 실험이다. 첨가된 glycated-LDL의 양이 증가할수록 cell의 분화가 증가되는 모습을 나타내고 있다. Fig. 1에 나타난 결과로 glycated-LDL이 macrophage의 생존과 분화에 영향을 끼친다는 것과 또한 glycated-LDL의 유무에 따른 cell의 분화정도를 비교하였을 때,

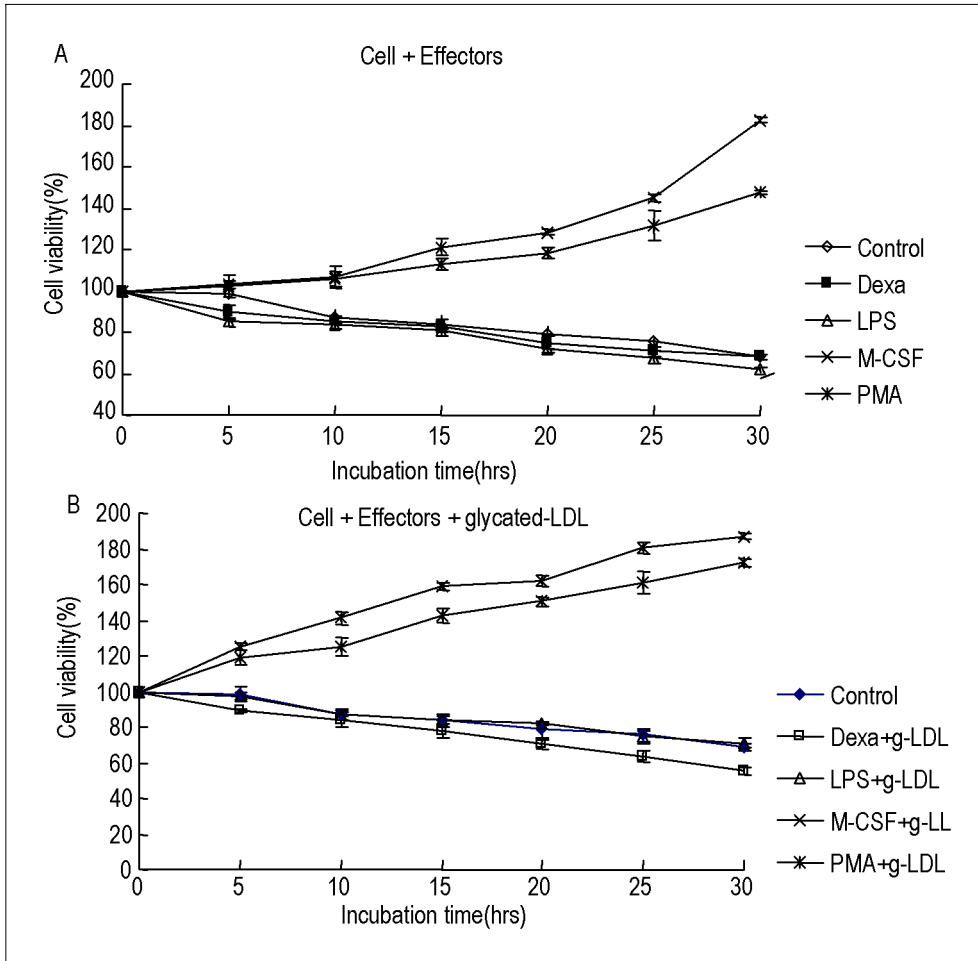


Fig. 7. Influences of effectors on cell viability and differentiation.

A. Each effector was added to macrophage cell and incubated for 30hours. Then MTT assay was performed

B. Glycated-LDLs were added to the same condition of A and MTT assay was tested

glycated-LDL이 macrophage에 영향을 주기 때문에, 이와 관련된 질병에 연관성이 있음을 알 수 있었다.

glycation time의 변화에 따른 macrophage의 분화를 비교하여 보았으며 (Fig. 2), 결과와 같이 glycation의 시간이 길어질수록 cell의 분화가 증가됨을 보여주고 있다. 이러한 결과는 이미 발표된 논문²²에 나타난 결과와 유사한 결과를 보여주고 있다. 즉, glycation의 정도가 커질수록 AGE product의 하나로 알려져 있는 pentosidine의 생성

량이 native-LDL에 비해 높아져 간다는 것이며, 또한 glycation이 진행될수록 변화되는 NH₂ residue의 양이 감소됨을 TNBS시약을 이용하여 확인하였다²². 이러한 결과로부터 glycated-LDL과 같은 modify된 LDL (glycated-LDL)이 정상 LDL에 비해 macrophage의 분화에 영향을 준다는 것을 확인하였다.

2. Macrophage의 분화에 미치는 glycated-LDL 및 effector의 영향

Macrophage의 분화에 영향을 주는 4개의 effector

를 이용하여 glycated LDL과의 관계를 알아보았다 (Fig. 3~6). 먼저 Fig. 4의 경우는 macrophage에 glycated-LDL과 M-CSF를 넣은 후 시간에 따라 배양한 결과이다. cell만 존재하는 control보다 M-CSF를 같이 넣어 주었을 경우, cell의 생존력이 2~3배 정도 증가한다는 것을 알 수 있으며, 이 결과는 M-CSF와 glycated-LDL이 직접적으로 세포의 분화에 영향이 있음을 보여주고 있다. effector의 최적농도 조건을 알아내기 위한 M-CSF의 선행한 실험의 결과 최적농도는 15 ng/mL이었다. Fig. 4에서는 effector로서 PMA를 사용하였으며 PMA도 cell의 분화와 생존력에 끼치는 영향면에 있어서, M-CSF와 유사한 결과를 나타내고 있다. 첨가된 PMA의 농도는 120 ng/mL이다. Fig. 5, 6은 Fig. 3, 4의 결과와 반대의 pattern을 보였으며, PMA와 M-CSF를 처리하였을 때 나타난 결과와는 다른 결과를 보였다. 즉, LPS와 dexamethasone을 처리했을 경우 전반적으로 cell만을 배양한 control보다 cell의 분화가 감소된다는 결과를 나타내주고 있다.

Macrophage 분화에 미치는 각 effect의 영향을 비교하기 위하여 네 개의 effector를 이용하여 얻은 결과를 기초로, 각각의 effector에 의한 세포의 분화정도를 비교 분석한 결과는 Fig. 7에서 잘 보여주고 있다. Fig. 7-A는, 먼저 각각의 well에 네 개의 effector만 처리하여 얻은 결과이며, 시간의 경과에 따라 control을 기준으로 하여 각각의 effector에 의한 cell의 differentiation을 백분율로 나타낸 결과이다. M-CSF와 PMA의 경우는 control에 비해 시간이 경과함에 따라 cell의 분화가 현저히 증가하는 곡선을 보여주는 반면, dexamethasone과 LPS의 경우는 오히려 control보다 cell의 분화가 급격하게 감소되고 있음을 보이고 있다. Fig. 7-B의 경우는 Fig. 7-A와 같은 실험조건에 90 μ L의 60일 된 glycated LDL을 첨가하였을 때 나타난 결과를 보여주고 있다. Fig. 7-B도 Fig. 7-A와 유사한 결과를 보이지만 Fig. 7-A보다도 더 높은 정도를 나타내므로써, glycated-LDL의 coinubation

에 의해, macrophage cell의 분화에 현저한 차이를 보여주었다.

고 찰

당뇨 환자의 경우 정상인보다 혈중의 glucose 농도가 적게는 2~3배 높은 수준을 유지하고 있으며, 높은 혈중의 glucose 농도는 lipoprotein, hemoglobin, albumin, collagen 등과의 nonenzymatic reaction을 통해 connective tissue나 단백질 등의 구조를 변화시키기도 하고 동맥경화 같은 혈관 질환을 일으키는 주된 원인으로 알려져 있다^{11,12,13,15}. Glycation의 말기 생성물인 AGE (advanced glycation end product) product는 aldose와 protein의 상호작용에 의해 생성되며 특징적으로 yellow-brown color를 나타내는 product이다^{16,25}. 정상인들도 나이가 들어감에 따라 혈관벽이나 조직 등에서 glycated protein 이나 glycated lipid 등이 축적되어 있는 것이 관찰되지만 혈중에 높은 glucose 농도를 갖는 당뇨병 환자의 경우 이러한 AGE의 형성과 침착이 훨씬 높아지는 것으로 보고되어 있다²⁵. 본 연구에서는 macrophage, glycated-LDL 및 effector가 존재할 때와 존재하지 않을 때를 비교하여 effector들이 macrophage cell의 differentiation에 미치는 영향을 연구 하였다. Effector로는 M-CSF, PMA, LPS, dexamethasone을 사용하였으며 macrophage는 인간의 혈액에서 분리한 단핵구 (monocyte)를 분화시켜, 본 실험에 사용하였다. 현재까지의 관련된 연구로서는, M-CSF는 macrophage에 의한 acetylated-LDL의 uptake와 degradation 및 cholesterol의 esterification을 촉진시키고 또한 Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) rabbit에 M-CSF를 지속적으로 처리하면 aorta에 cholesterol ester의 축적이 크게 감소된다는 것들이 보고되고 있다^{9,10,19,26}. PMA는 macrophage의 scavenger receptor의 발현을 증가 시켜주고, mRNA수준도 증가시켜주는 것으로 알려져

있다²⁷. LPS, dexamethasone 등은 macrophage scavenger receptor의 activity를 suppress하여 modified-LDL의 uptake를 저해하는 물질로 알려져 있으며, 이러한 효과는 이들의 농도에 따라 다른 결과를 나타내기도 한다. 한편, LPS는 ox-LDL과 함께 macrophage의 분화를 촉진한다는 논문이 있기도 하다²¹. AGE product²⁴ 또는 oxidized-LDL²⁸는 GM-CSF에 의하여 macrophage의 분화를 증가시킨다는 보고도 있다. dexamethasone은 동물실험에서 동맥경화를 억제한다는 보고도 있다²⁹.

본 실험에서는 *in vitro*에서, macrophage에 effector가 미치는 영향을 비교 하였다. M-CSF와 PMA의 경우는 macrophage 혹은 macrophage와 glycated-LDL이 같이 존재할 때 높은 macrophage의 분화 속도를 보였으며, LPS와 dexamethasone은 그 반대의 효과를 보여주었다. 이러한 결과로, effector들과 glycated-LDL이 체내에 공존할 때, macrophage의 분화를 가속화하여 동맥경화의 발병을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다. 또한 glucose와의 incubation에 의해 얻어지는 (당뇨에서 발생하는) glycated-LDL은 glycation의 시간이 길어질수록 macrophage의 viability와 differentiation을 증가시켰다 (Fig. 2). 위의 결과로 부터 modified-LDL에 의한 macrophage의 분화에 stimulator로 작용하는 M-CSF와 PMA는 혈중에 glycated-LDL이 존재할 경우, 동맥경화의 촉진인자로 작용할 수 있음을 알 수 있었고, LPS와 dexamethasone의 경우는 반대의 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 본 연구에서는 직접적으로 macrophage와 glycated-LDL 그리고 몇 개의 effector들을 통한 cell과의 cocubation을 통해 동맥경화에 끼치는 glycated-LDL의 영향 및 effector들의 효과를 알아 보았다. 여기서 얻어진 결과를 통해, 정확한 mechanism은 아직 알려져 있지 않지만, 사용된 effector들이 glycated-LDL과 존재할 때 macrophage에 stimulator 혹은 inhibitor로서 역할을 나타낸다는 것을 알 수 있었고, 혈중 glucose의 농도가 높아지게 되면 여러 조직이나 혹은 단백질, 지질

등과의 결합을 통해 당뇨병과 관련된 합병증을 일으킬 수 있는 가능성이 높아진다는 사실을 다시 한번 확인시켜 주었다.

참 고 문 헌

1. Kannel WB, Wolf PE, Verter J. Manifestation of coronary disease predisposing to stroke. JAMA 1983;250:2942-2946
2. Jonasson L, Holm J, Skalli O. Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerosis plaque. Arteriosclerosis 1986;6:131-136
3. Ross R: Atherosclerosis. A problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. Arteriosclerosis 1981;1:293-305
4. Hsu HY, Nicholson AC, Hajjar DP. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor- α transcriptionally regulated. J Biol Chem 1996;271:7767-7773
5. Bottalico LA, Wager RE, Agellon LG, Assoian RK, Tabas I. Transforming growth factor- β inhibits scavenger activity in THP-1 human macrophages. J Biol Chem 1991;266:22866-22871
6. Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, and Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. Current Opinion in Lipidology 2000;11:503-509
7. Ishibashi S, Inaba T, Shimano H, Harada K, Inoue I, Mokuno H, Mori N, Gotoda T, Takaku F, Yamada N. Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated LDL and cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem 1990;265:14109-14117
8. Becker S, Kim M, Haskill S. Colony-stimulating

- factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J Immunol* 1987;139:3703-3709
9. Bartocci, A. Macrophage specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 6179-6183
10. Tsuchiya S. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982;42:1530-1536
11. Hayden JM and Reaven PD. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2 : a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Current Opinion in Lipidology* 2000;11:519-528
12. Brian J, Alan VL, Fogelman M, Seager J, Ribi E, Haberland ME, Edwards PL. Bacterial endotoxin selectively prevents the expression scavenger-receptor activity on human monocyte-macrophages. *J Immunol* 1985;6:3718-3721
13. Lyons TJ. Glycation and Oxidation. A role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993;71:26B-31B
14. Brownlee M. Non-enzymatic glycosylation of macromolecules: Prospects of Pharmacologic modulation. *Diabetes* 1992;41:57-60
15. Hermann E, Martina DR, Georg WS, Gunther J. Biochemical, Structural and Functional Properties of Oxidized Low Density-Lipoprotein. *Chemical Research in Toxicology* 1990;3:236-254
16. Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidation of Glycated Proteins: age-dependent accumulation of N ϵ -(Carboxymethyl)-lysine in human lens proteins. *Biochemistry* 1989;28: 9161-9168
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
18. Seishi T, Tamiko S, Shu IS. Nonenzymatic glucosylation of human serum albumin and its influence on binding capacity of sulfonyleureas. *Biochemical Pharmacology* 1984;29:67-2971
19. Choi JH, Park YJ, Son HS, Kim TW. Functional properties of modified LDL and degradation of modified LDL human monocyte-macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1995;24:362-369
20. Fogelman AM, Haberland ME, Seager J, Hokom M, Edwards PA. Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J Lipid Res* 1981;22:1131-1141
21. Sakai M, Miyazaki A, Hakamata H, Sasaki T, Yui S, Yamazaki M, Shichiri M, Horiuchi S. Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J Biol Chem* 1994;269:31430-31435
22. 김기모, 김태웅. Glycated-LDL이 macrophage 및 fibroblast와의 결합력 연구. *한국지질학회지* 1997;7:1-10
23. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: Pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad U S A* 1993;90:6434-6438
24. Satoru Y, Toshinori S, Norie A, Seikoh H and Masatoshi Y. Induction of macrophage growth by advanced glycation end products of the maillard reaction. *J of Immunol* 1994;152: 1943-1949
25. Inoue I, Inaba T, Motoyoshi K, Harada K, Shimano H, Kawamura M, Gotoda T, Shiomi M, Watanabe Y. Monocyte colony-stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 1992;93:245-254
26. Werb Z, J. R Chin. Endogoxin suppresses expression of apoprotein E by mouse

- macrophages in vivo and in culture. *J Biol Chem* 1983;258: 10642-10648
27. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-261
28. John AH, Damian M, Wendy J, Fiona C, Robert B, Genevieve W and Suzanne M. Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:98-105
29. Asai K, Funaki C, Hayashi T, Yamada K, Naito M, Kuzuya M, Yoshida F, Yoshimine N, and Kuzuya F. Dexamethason-induced suppression of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Possible mechanism. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:892-899